

LAS CÉLULAS MADRE Y LA MEDICINA REGENERATIVA. DE LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS A LA REPROGRAMACIÓN CELULAR

Jaime Millás Mur^a

Fechas de recepción y aceptación: 1 de marzo de 2010, 27 de marzo de 2010

Resumen: La capacidad terapéutica de las llamadas células madre constituye, tal vez, el tema de experimentación de mayor trascendencia actualmente. El avance de la medicina regenerativa en estos últimos años pone al alcance de todos la posibilidad de aliviar, si no curar, muchas enfermedades que hasta ahora no tenían remedio. Por otro lado, se clarifica el camino por donde debe transitar una investigación seria que pretenda lograr los mejores resultados y, al mismo tiempo, respetar la dignidad del ser humano. Las células madre adultas (ASC) son utilizadas actualmente para diferentes terapias, y están a punto de salir al mercado medicamentos obtenidos a partir de ellas que han pasado ya las distintas fases de experimentación requeridas para su uso. La clonación por transferencia nuclear (TN) parece casi imposible de conseguir en seres humanos y las células madre de origen embrionario (ESC) son inmanejables. Sin embargo, la apuesta por la reprogramación de células somáticas que da lugar a las células iPS (*induced pluripotent stem cells*) parece ser la vía para obtener distintos linajes celulares aplicables al propio paciente sin riesgo de rechazo. Aunque hay que resolver aún algunos problemas, como la forma más adecuada de transformar las células somáticas en células iPS, ya es posible trabajar con ellas para conocer mejor las patologías y los efectos de los diferentes fármacos sobre diversas enfermedades, así como el proceso de diferenciación. Además,

^a Grupo de Investigación en Bioética. Área Departamental de Ciencias Biomédicas. Universidad de Piura (Perú).

Correspondencia: Jaime Millás Mur. Universidad de Piura, Av. Ramón Mugica 131, Urb. San Eduardo-Piura (Perú). Área Departamental de Ciencias Biomédicas. E-mail: jmillasmur@turicara.edu.pe



se plantea la combinación de la terapia génica con la reprogramación celular para curar determinadas enfermedades genéticas como la hemofilia (1).

Palabras clave: células madre embrionarias (ESC), células madre adultas (ASC), clonación por transferencia nuclear (TN), células iPS (*induced pluripotent stem cells*).

Abstract: The therapeutic capacity of the so-called stem cells is perhaps an experimental subject of the greatest importance today. The advancement of regenerative medicine in recent years makes available to everyone the opportunity to alleviate, if not cure, many diseases that until now have had no remedy. On the other hand, it clarifies the way in which serious research must travel if it is to achieve the best results, while respecting the dignity of human beings. Adult stem cells (ASC) are currently used for various therapies. Some medicinal products derived from them have passed the different stages of testing required for its use and are about to go to market. Cloning by nuclear transfer (NT) seems nearly impossible in humans and embryonic stem cells (ESC) are intractable. Nevertheless betting on the reprogramming of somatic cells that give rise to iPS cells (induced pluripotent stem cells) seems to be the path to obtain different cell lines to be applied to the same patient without risk of rejection. Although there are still some problems to solve, such as finding the best way to transform somatic cells into iPS cells, it is possible to work with them to understand better the pathologies and the effects of different drugs on different diseases and the process of differentiation. In addition, there is the combination of gene therapy with cell reprogramming to cure certain genetic diseases such as haemophilia.

Keywords: embryonic stem cells (ESC), adult stem cells (ASC), cloning by nuclear transfer (NT), iPS cells (induced pluripotent stem cells).

1. INTRODUCCIÓN: LA CÉLULA (2)

La unidad vital del ser vivo es la célula. Su apariencia es la de un globo repleto de líquido en el que flotan diversos orgánulos, como el retículo endoplasmático, que contiene los ribosomas, el aparato de Golgi, los lisosomas, las vacuolas, las mitocondrias, donde se realiza la respiración celular, etc. En el centro del llamado citoplasma se encuentra el núcleo celular que contiene el ADN o ácido desoxirribonucleico, constituido por bases púricas y pirimidínicas, como la adenina, la guanina, la citosina y la timina. Estas bases son complementarias, de tal forma que frente a una adenina va siempre una timina y frente a una guanina va siempre una citosina. Ello permite la reparación de esta macromolécula, cuya estructura es la de una doble hélice, como descubrieron Watson y Crick en 1953. Además, conforman el ADN un azúcar (la desoxirribosa) y un grupo



fosfato. Base, azúcar y grupo fosfato unidos forman el llamado nucleótido, que es la unidad estructural del ADN. En el núcleo, que está rodeado por una membrana nuclear, también hay proteínas como las histonas, que se ensamblan con el ADN. En éste se encuentra la información que, a través del ARNm (Ácido ribonucleico mensajero), pasará al citoplasma, donde los ribosomas la leerán y formarán las proteínas específicas de la célula.

Está limitada por una membrana formada por una doble capa de fosfolípidos unida a glúcidos, colesterol y proteínas que permite un equilibrio entre el medio externo y el interior de la célula; de este modo pueden atravesarla algunas moléculas, iones, etc., de forma muy selectiva, manteniéndose estable el medio intracelular. La célula recibe señales del exterior gracias a las proteínas de membrana que hacen de receptores. En el núcleo se originan respuestas que pueden relacionarse con su crecimiento o diferenciación. Las células crecen y se multiplican. El ciclo celular está regulado por unas proteínas llamadas ciclinas, que son, a su vez, activadas por enzimas conocidas como quinasas, que fosforilan a las ciclinas para activarlas. La vida de la célula es dinámica y supone un proceso permanente de cambio que requiere muchas interacciones bioquímicas. Poco a poco, vamos conociendo mejor las cuatro fases del ciclo celular, los procesos de diferenciación que darán lugar a los distintos tipos celulares, así como la vía de *apoptosis* o muerte celular programada.

2. CÉLULAS MADRE

Como dijo Virchow: "Omnis cellula ex cellula". En ese sentido, a toda célula de la que surgen otras células se le puede llamar madre; sin embargo, actualmente entendemos por células madre o células troncales (*stem cells*, en inglés) aquellas células que, por su plasticidad y potencialidad de diferenciación, así como por su capacidad generativa, dan lugar tanto a células similares que conservan las mismas capacidades como a otro tipo de células que han optado ya por un tejido específico. Estas células madre las podemos ordenar, según su potencialidad, en totipotentes, pluripotentes, multipotentes, progenitoras y unipotentes, según den lugar a todo el organismo (totipotentes) o a un único tipo de células (unipotentes). La única célula totipotente es el cigoto, que dará origen al cuerpo entero; después, en los tejidos del embrión, podemos encontrar células pluripotentes que darán lugar a tejidos de las tres capas embrionarias; y, luego, ya en cada órgano, podemos encontrar células multipotentes, como las de la médula ósea, de las que se originan diversos tejidos celulares, u otras que sólo dan lugar a las diferentes células de la sangre o células ya diferenciadas a término. Actualmente, se va encontrando que en prácticamente todos los órganos hay células madre, y que su plasticidad es mucho mayor de lo que se pensaba.



3. FECUNDACIÓN IN VITRO Y CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Aunque ya mucho antes, en 1960, se había descubierto el papel de las células madre, con las investigaciones de Ernest McCulloch y James Hill, del Instituto del Cáncer de Ontario, en Canadá, en el trasplante de médula ósea en ratones, no cabe duda de que la fecundación in vitro, en 1978, con la consiguiente disposición de embriones humanos, ofreció la posibilidad de su utilización instrumental en la investigación. James Thompson, del Centro de Investigación en Primates de la Universidad de Wisconsin, de Madison, en Estados Unidos, descubrió en 1998, junto con colaboradores de otros centros, el potencial de las células madre de la masa interna del embrión en fase de blastocisto (3). Concretamente, las células embrionarias así obtenidas tenían tres características: 1) se mantenían indefinidamente, siempre y cuando se fueran cambiando a un medio fresco, lo que les permitía durar muchos meses, cuando lo habitual en las células animales es que mueran al poco tiempo (también se pueden conservar a bajas temperaturas); 2) no presentaban aberraciones cromosómicas, lo que se puede comprobar por la presencia de la enzima telomerasa; 3) conservaban su potencial de diferenciación, que se comprueba al constatar los teratomas producidos en ratones, en los que se distinguían los tipos celulares derivados de las tres capas embrionarias.

Aunque este descubrimiento es interesante, surge un problema ético, dado que para la obtención de las ESC es necesaria la muerte del embrión. También es preciso comprobar, desde el punto de vista científico, las posibilidades terapéuticas reales de este tipo de células para no crear falsas expectativas.

A la hora de pensar en una acción terapéutica a partir de las ESC surgen dos problemas: el primero es la capacidad de crecimiento y la multiplicación de estas células, que las lleva a formar teratomas, y, el segundo, el rechazo inmunológico que causan al introducirlas en otro organismo. Para evitar este último problema se ha intentado la clonación por TN, que explicaremos en el siguiente apartado.

Además, se ha comprobado que no son genéticamente estables y que su diferenciación es impredecible a largo plazo (4). Por el momento, lo único que podemos comentar es que apenas hay 11 protocolos de experimentación con ESC y unos 3.023 con células madre adultas, como recoge la página web <www.clinicaltrials.gov>. Tampoco la totalidad de las ESC se han ensayado con enfermos. En enero del 2009, la FDA de Estados Unidos aprobó un ensayo clínico en fase 1 con ESC para enfermos con lesión en la médula espinal (5). Este permiso fue revocado pocos meses después, debido a la aparición de quistes en los ensayos previos en animales. A finales de julio del 2010 la FDA concedió la autorización para continuar con las pruebas en seres humanos.

4. CLONACIÓN POR TRANSFERENCIA NUCLEAR

Para eludir el problema del rechazo que surge al introducir células madre embrionarias obtenidas de un embrión sobrante de la FIV (fecundación in vitro), algunos científicos plantearon la posibilidad de clonación por transferencia nuclear y la llamaron *clonación terapéutica*, para distinguirla de la llamada *clonación reproductiva*. Esta técnica consiste en la introducción del núcleo de una célula somática en un ovocito previamente enucleado. Posteriormente, por estimulación provocada por una corriente eléctrica, el ovocito, que contiene una información genética diploide, comienza su desarrollo comportándose como si fuera un embrión. Esta técnica, como aparece en la revista *Nature* (Wadman, 2007), comenzó en 1938 con Hans Spemann, de la Universidad de Friburgo. En 1952, Robert Briggs y Thomas King, de la Universidad de Filadelfia, clonaron ranas con ovocitos y núcleos de células somáticas de renacuajos. De 1964 destacan los trabajos del británico John Gurdon (6), quien estudió el desarrollo embrionario en sapos por medio de clonación. El procedimiento consistió en extraer núcleos de células somáticas del epitelio intestinal del sapo africano *Xenopus laevis* e introducirlos en ovocélulas no fertilizadas de la misma especie a las que previamente se extrajo el núcleo. Tras varias divisiones in vitro, y una vez alcanzado el estado de blástula, se disgregaron los blastómeros y se extrajeron los núcleos con el fin de implantarlos en un conjunto de óvulos enucleados para obtener un clon de individuos idénticos a los que habían aportado el núcleo. Estos experimentos sirvieron para demostrar la capacidad de reprogramación del núcleo de las células somáticas y su potencialidad para dar lugar a un nuevo embrión (7). En 1984, un grupo de investigadores chinos clonaron carpas sobre la base de células de riñón. Por último, en 1997, Ian Wilmut, del Instituto Roslin de Edimburgo, consiguió la clonación de la famosa oveja Dolly, a partir de ovocitos y núcleos de células somáticas. Previamente había obtenido carneros por *paraclonación* con células embrionarias. Para llegar a Dolly hizo falta conseguir que el núcleo de la célula somática fuera reprogramado hasta situarlo en una fase G0, de tal forma que el cigoto así obtenido iniciara su desarrollo embrionario. Para ello fueron necesarios 277 intentos, lo que da una idea de la dificultad y baja efectividad de la técnica.

Después vinieron las clonaciones de ratones, como en la Universidad de Hawai, la clonación de terneros por investigadores japoneses y, en el 2002, la clonación en Texas del primer gato y, algo más tarde, en Italia, la del primer caballo. En el 2005 Hwang clonó en Corea el primer perro afgano, hecho que hubo de confirmar la Universidad de Seúl a causa del fraude en el que estuvo involucrado este científico. Como ya dijimos anteriormente, la eficiencia de estas técnicas es muy baja. Fue necesario producir 1.095 embriones y transferirlos a 123 perras. Sólo uno sobrevivió.



En cuanto a la clonación de primates, ésta se llevó a cabo en el 2007, con el equipo del Centro Nacional de Primates de Oregón, a cargo de Shoukrat Mitalipov, que clonó un *Macacus rhesus*. Para ello se utilizaron 304 ovocitos y se obtuvieron dos líneas de células madre embrionarias.

Los animales clonados hasta ese momento presentaron problemas de envejecimiento prematuro, enfermedades congénitas, procesos reumáticos y degenerativos, etc., lo que lleva a pensar que el procedimiento no tiene una aplicación terapéutica próxima en el tiempo.

En cuanto a la clonación humana, se han realizado varios intentos y, aunque se ha anunciado en repetidas oportunidades, no hay constancia de que se haya llevado a término. En el 2001 fue Cibelli, del equipo de Lanza; luego lo intentaron los chinos Cheng y Guangxin, en el 2003. Un año más tarde apareció la tristemente célebre publicación del coreano Hwang, quien dijo haber clonado a un ser humano a partir de material genético de células de tipo embrionario, para, más tarde, en el 2005, decir que había obtenido 11 líneas celulares a partir de células adultas del mismo número de pacientes por la llamada clonación por transferencia nuclear somática. En agosto de ese mismo año, Miodrag Stojkovic, del equipo de Allison Murdoch, de la Universidad de Newcastle, declaraba haber logrado la clonación humana.

Como en ninguno de estos experimentos se ha acreditado fehacientemente la obtención de células madre de los blastocistos clonados, no podemos estar seguros de que se haya realizado. Zavos, en el 2006, también afirmó haberlo logrado, pero no parece probable. En el 2008, investigadores de Stemagen Corporation, de la Jolla, en California, aseguraron haber obtenido blastocistos humanos a partir de clonación por transferencia nuclear y también partenogenéticamente. Sin embargo, mientras no haya un desarrollo de un ser humano vivo no podremos comprobar semejante afirmación.

Por lo tanto, dadas las dificultades existentes para realizar la clonación por transferencia nuclear, especialmente en primates y en seres humanos, y la consiguiente obtención de líneas celulares utilizables en una posible terapia que hasta ahora no existe, parece poco lógico seguir hablando de *clonación terapéutica*. Además, si se llegara a obtener un verdadero cigoto, habría que hablar de *clonación reproductiva*, aunque su finalidad fuera una posterior curación o tratamiento a partir de la masa interna del embrión producido. Para clarificar la situación es conveniente realizar algunas precisiones, tal como acertadamente hace la Dra. López Moratalla (8), de la Universidad de Navarra. Una cosa es un cigoto constituido por la fertilización de un óvulo y un espermatozoide, que dará lugar a un embrión en fase de blastocisto, y otra un ovocito desnucleado al que se le inserta un núcleo de una célula somática y que podrá dar lugar a un cuerpo embrioide con apariencia de blastocisto. En el primer caso, estamos ante un ser viviente de la raza humana que va pasando de embrión unicelular a blastocisto, y luego a las otras

fases de desarrollo embrionario en un continuo que, si no se interrumpe, dará lugar al nacimiento de un niño. En el segundo caso, estamos ante un grupo de células sin una organización ni unidad vital. Tal vez, si las condiciones son muy precisas y se perfecciona la técnica, pudiera lograrse un verdadero cigoto, pero de momento parece imposible.

También conviene poner en claro que la información genética contenida en el núcleo celular del cigoto no es todo. Hay una información epigenética que aparece a medida que se van expresando los genes y multiplicando las células y dependiendo del medio intra y extracelular, de las células que están alrededor, del llamado nicho en el que se encuentran, etc. Además, para que se ponga en marcha el desarrollo embrionario hace falta que la información genética se re programe, cosa que se hace de modo natural por la interacción entre los pronúcleos de espermatozoide y ovocito y que, al mismo tiempo, hace que desaparezca la impronta parental manifestada en la metilación de las citosinas. Esto no se da en una pretendida clonación por transferencia nuclear. Si algún día se consiguiera reprogramar el núcleo celular artificialmente, podríamos conseguir un embrión *somático* por contraposición a un embrión *gamético*, pero hasta el momento esto es ciencia ficción.

Ciertamente, la investigación con células de origen embrionario procedentes de los embriones de la fecundación in vitro, así como lo avanzado en la investigación sobre la posible clonación por transferencia nuclear, ha contribuido a un mayor conocimiento de aspectos relacionados con el origen de la vida, el desarrollo embrionario, la diferenciación, etc., que podrían dar lugar a futuras aplicaciones en medicina regenerativa. Sin embargo, hay que ser claros en reconocer que, hasta el momento, sólo han tenido cierto éxito algunos experimentos con animales, como el experimento realizado con ratas parapléjicas en tratamiento con neuronas derivadas de hESC (9). Con seres humanos sólo se ha anunciado, en Estados Unidos, el inicio de tratamiento de enfermos con daño medular, lo que resulta inaudito, teniendo en cuenta que este tipo de células genera problemas de histocompatibilidad y produce teratomas. Por otro lado, desde el punto de vista bioético, en la fecundación in vitro se producen embriones humanos que se tratan como material de desecho y de experimentación. Y en la clonación mal llamada *terapéutica* se pretende fabricar un embrión somático para utilizarlo como material de recambio. Todo esto provoca que se considere que tanto la FIVET como la TN carecen de la ética más elemental.

5. CÉLULAS MADRE ADULTAS

En contra de lo que comúnmente se piensa, no han sido los experimentos con embriones, sino los realizados con células adultas los que han dado inicio al estudio de las llamadas células madre. Los investigadores Ernest McCulloch y James Hill, del



Instituto del Cáncer de Ontario (Canadá), recibieron en el 2005 la medalla Lasker por sus trabajos realizados 45 años antes sobre trasplante de médula ósea en ratones. Pusieron así las bases para el desarrollo de la actual medicina regenerativa.

Actualmente, se ha avanzado mucho en la aplicación biomédica de células provenientes de los distintos tejidos del organismo adulto que conservan multipotencialidad; son las llamadas células madre adultas. Estas células son las encargadas de mantener y reparar los distintos tejidos, y se ha ido descubriendo su presencia en casi todos los diferentes tipos tisulares. Aunque hasta hace pocos años se pensaba que las ASC sólo daban lugar a células del tejido de procedencia, se ha demostrado fehacientemente que pueden originar diversos tipos celulares.

Destaca la terapia a partir de células madre de la médula ósea (10), de la que se pueden conseguir células de las diferentes capas germinales con las que se están tratando, desde alteraciones de las células sanguíneas hasta la reparación del corazón que ha sufrido un infarto, pasando por el tratamiento de la osteogénesis imperfecta y otras varias enfermedades causadas por degeneración de diversos tejidos. Todavía no se conoce bien la causa del alivio de las distintas patologías, que puede provenir de la transdiferenciación a células del tejido que requiere reparación o de la estimulación de los mecanismos endógenos de reparación del propio tejido enfermo por secreción de factores y efecto paracrino.

También es muy reciente la obtención de células madre a partir del tejido adiposo que Damián García Olmo ha conseguido en el Hospital Universitario de La Paz en Madrid, y cuyo primer medicamento está a punto de sacar al mercado europeo, tras superar las fases de experimentación necesarias. Este remedio servirá para el tratamiento de fístulas perianales (11). La diabetes y algunas patologías vasculares son objeto también de terapia con estas células. Las células madre obtenidas a partir de la fracción vásculo-estromal del tejido adiposo dASC (*Adipose-derived Stem Cells*) se descubrieron el año 2001 y se identificaron como células con una morfología fusiforme, capaces de diferenciarse en adipocitos, condrocitos y osteocitos, y con unos marcadores de membrana específicos: CD9, CD29, CD44, CD51, CD59, CD90, CD105, HLA 1 y D7-FIB. También se ha descrito diferenciación a células de músculo esquelético y cardiaco, hepáticas, endotelio vascular, epitelio y tejido pancreático, lo que las convierte en células de una potencialidad muy amplia. Además de la diferenciación del tejido necesitado de reparación y de los efectos señalados anteriormente para las células madre provenientes de otros tejidos del organismo adulto, las dASC poseen una actividad inmunomoduladora que inhibe los procesos inflamatorios, lo que nos lleva a pensar en tratamientos de enfermedades como la artritis reumatoide o la colitis intestinal, que ya han sido tratadas con estas células en experimentos con animales en los que han aliviado la inflamación y controlado la respuesta de las células T (12). Además, las dASC son muy seguras, pues, según los

estudios realizados, en seis meses de cultivo no han sufrido alteraciones fenotípicas ni cariotípicas (13).

Otra fuente importante de células madre es el cordón umbilical. Las llamadas SCU se encuentran en mayor proporción que en la médula ósea y sus aplicaciones pueden ser convenientes para unas cuarenta enfermedades. Desde Minnesota se ha coordinado un estudio con varios centros y se ha comprobado que es la mejor opción para algunos tipos de leucemia (14). Asimismo, en trasplantes alogénicos hay una menor agresividad inmunológica, que podría ser debida a la regulación de linfocitos T, lo que facilita la creación de bancos públicos y privados de este tipo de células.

6. REPROGRAMACIÓN CELULAR: LAS CÉLULAS IPS

Primero fueron las células madre embrionarias y luego el intento de clonación por transferencia nuclear. El fin era obtener células pluripotenciales capaces de diferenciarse en diferentes tipos celulares para regenerar tejidos afectados por diversas patologías. Como sabemos, las células madre embrionarias obtenidas de embriones “sobrantes” de la FIV tienen varios problemas: en primer lugar, su tendencia a formar teratomas y, en segundo lugar, su histocompatibilidad por provenir de un ser humano distinto del que va a recibir el producto diferenciado de origen embrionario. Después se buscó la posibilidad de clonación por transferencia nuclear para obviar el problema del rechazo inmunológico, pero no consta que se haya conseguido en seres humanos. Lo que se pretendía era obtener líneas celulares pluripotenciales de enfermos para tratar de curar las diversas patologías mediante la diferenciación de esas células, que podían también ser objeto de terapia génica para modificar una alteración de su genoma.

Cuando la única terapia efectiva era la obtenida mediante ASC, surgió una nueva técnica que tiene como autor al equipo de S. Yamanaka. Estos investigadores realizaron un experimento en ratones que consistió en la reprogramación de células somáticas mediante un grupo de genes transferidos mediante un retrovirus (lentivirus). Después de muchas pruebas con 24 posibles genes que están asociados a las células madre embrionarias, Yamanaka se quedó con 4: *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* y *cMyc*, lo que les permitió obtener células con características troncales. Por su modo de obtención, las calificó como células pluripotenciales inducidas (*induced Pluripotent Stem cells: iPS*) (15). Hay que destacar el ingenio para determinar la obtención de las células iPS mediante fibroblastos embrionarios de ratón mutantes (*knock-out*) para el gen *Fbx15*, de expresión específica en células ES. Este *locus* administraba la expresión de un *cassette* de resistencia al antibiótico G418. Entonces, cuando había verdadera transformación de células somáticas a iPS, se producía la activación de *Fbx15*, con la consiguiente resistencia al G418. En una reciente publicación que revisa el avance en la investigación sobre reprogramación celular, se ha



llegado a la conclusión de que el potencial terapéutico de las células iPS es enorme (16). Es importante señalar los trabajos del grupo de Rudolf Jaenisch del MIT, que reprodujo el experimento de Yamanaka en ratones; además, consiguió transmitir por vía germinal el genotipo de las nuevas células iPS, al inyectarlas a blastocistos de ratón, y aportó también pruebas moleculares del estado de reprogramación y epigenético de las células iPS que las hacía indistinguibles de las células ES (17).

Posteriormente, el propio Yamanaka describe la obtención de células iPS a partir de fibroblastos de la dermis de una mujer de 36 años mediante los mismos cuatro genes ya nombrados. La morfología, expresión genética, antígenos de superficie, capacidad proliferativa, actividad telomerasa y estatus epigenético eran equivalentes a las ESC (18). Casi al mismo tiempo, el grupo de J. A. Thompson obtuvo células iPS humanas a partir de fibroblastos fetales, mediante genes algo diferentes: *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* y *Lin28* (19). Las células iPS obtenidas fueron inyectadas de modo intramuscular en ratones inmunodeficientes y se observaron teratomas con múltiples tipos celulares de las tres capas embrionarias, lo que confirma su pluripotencia.

Las posibilidades terapéuticas de las células iPS son muy grandes, teniendo en cuenta que se comportan como embrionarias. De ellas podemos obtener cualquier tipo celular y aplicarlo en medicina regenerativa. Además, en principio, no presentan ningún inconveniente ético, dado que no se recurre al uso de embriones humanos. Ciertamente, como cualquier otra cosa, podrían utilizarse con fines poco rectos, pero su punto de partida es absolutamente incuestionable, lo que no sucede con las células embrionarias. La manera de tratar una patología causada por una degeneración tisular sería la siguiente: tomar una célula somática sana del paciente y aplicar el procedimiento ideado por Yamanaka para obtener células iPS, de las que se extraerían las células diferenciadas necesarias para aplicarlas al enfermo.

El mismo grupo de Jaenisch ideó y puso en práctica un procedimiento para confirmar el potencial terapéutico de las células pluripotenciales inducidas. Lo hizo a partir de células iPS obtenidas de ratones con anemia falciforme y modificadas genéticamente, para corregir el defecto asociado al gen de las beta globinas que causa la enfermedad. Una vez seleccionadas y amplificadas, las diferenciaron a células progenitoras de la sangre. Eliminaron las células de la médula ósea de los ratones y repusieron las nuevas células modificadas, que repararon el sistema inmunológico y originaron nuevos hematíes sanos que curaron la patología (20).

Es probable que pronto las células iPS se constituyan en una importante alternativa terapéutica para el ser humano, pues parten con la ventaja de que, al obtenerse del mismo paciente, no presentan problemas de rechazo inmune. Sin embargo, aún no hay un ensayo clínico similar al descrito en ratones. Falta por resolver su tendencia a producir teratomas y la utilización de retrovirus para obtenerlas. No obstante, se comenzó a

trabajar con adenovirus y con plásmidos en procedimientos que permiten eliminar los virus portadores de los cuatro genes necesarios para la reprogramación. El equipo de Jaenisch, una vez más, obtuvo células iPS de pacientes de Parkinson con un mínimo resto de virus gracias a la enzima Cre-recombinasa, que facilitó el desacoplamiento del ADN vírico. Luego, a partir de esas células iPS, se obtuvieron neuronas dopaminérgicas que fallan en esos enfermos (21).

En la línea de mejorar la técnica de obtención de células iPS, destaca el método de trabajo del equipo de Shing Deng, del Scripps Research Institute, de la Jolla (California), junto al de otros centros de investigación. Ellos han utilizado proteínas recombinantes producidas con *Escherichia coli*, que añadieron al cultivo de fibroblastos embrionarios de ratón probando diversas mezclas hasta obtener células iPS sin necesidad de introducir genes (22).

También se ha logrado conseguir el paso directo de células diferenciadas de un tipo a células diferenciadas de otro tipo, sin pasar por células iPS. Douglas Melton, con su equipo del Harvard Stem Cell Institute, logró obtener células beta, que producen insulina en el páncreas, a partir de células exocrinas. El procedimiento se realizó in vivo, mediante la transcripción de nueve factores que operan en las células beta. Los ratones diabéticos en los que se llevó a cabo la reprogramación celular tuvieron una sensible mejora en su hiperglucemia. En cualquier caso, esta investigación es aún básica, pues requiere emplear retrovirus para la reprogramación directa (23).

Hace pocos meses, científicos de la Academia de Ciencias de China, dirigidos por Qi Zhou, han logrado obtener, a partir de células iPS tomadas de la piel de ratón y mediante la técnica llamada complementación tetraploide, 27 ratones vivos. Además, las hembras eran fértiles, por lo que las características de los primeros ratones han pasado a la segunda generación (24). Esto constituye una fehaciente demostración de la totipotencialidad de las células iPS. Ciertamente, si se perfecciona esta técnica en seres humanos, cabría la posibilidad de fabricar embriones a la carta, lo que sería de alguna manera corromper un procedimiento que ha abierto el camino de la ética científica.

Por otro lado, la sangre del cordón umbilical es la nueva fuente de células iPS con unas características muy especiales; al estar formada por células jóvenes que no han sufrido mutaciones y por su inmadurez inmunológica y el hecho de que se pueden programar con sólo dos factores, el Oct4 y el Sox2, son la mejor alternativa para la técnica de pluripotencialidad por inducción (25).

Estas investigaciones con células iPS han despertado tal interés en el mundo científico que I. Wilmut, el investigador mundialmente conocido por el experimento de clonación que dio lugar a la oveja Dolly, optó por abandonar las investigaciones en clonación por transferencia nuclear y células embrionarias para dedicarse a esta nueva vía abierta por



Yamanaka. Posteriormente, en una entrevista para el portal Gène-étique, de la Fundación Jérôme Lejeune, decía que

Antes de que se descubrieran la células iPS, intentábamos derivar células madre a partir de embriones producidos transfiriendo un núcleo celular de un paciente aquejado de una enfermedad hereditaria. Hasta hoy, nadie lo ha conseguido. Pero la des-diferenciación de células somáticas de ratón (método del profesor Yamanaka) ha demostrado que se puede alcanzar el mismo objetivo usando directamente células somáticas de los enfermos. (...) como comprobé con la oveja Dolly, clonar exige un tiempo considerable hasta obtener células madre. Además, esta técnica implica necesariamente someter a la mujer a estimulación ovárica, mediante un tratamiento hormonal intensivo y penoso, para producir gran número de ovocitos y al final no obtener más que algunos embriones clónicos. Si la ciencia ofrece vías más rápidas, interesantes y eficaces, creo que es mejor seguirlas (26).

Las posibilidades terapéuticas de las células iPS son extraordinarias. Aunque no sabemos cuándo se concretarán en seres humanos, porque todavía quedan dificultades por solucionar. Vemos que se van superando muchas trabas en poco tiempo, como limitar el período de pluripotencia a lo rigurosamente necesario y diferenciar lo antes posible las células; no utilizar el gen *c-Myc*, que conlleva el peligro de tumorigénesis; no recurrir a la modificación genética, sino reprogramar por procedimientos químicos o proteínas recombinantes; prescindir de vectores retrovirales, etc. (27). Por ello, en algo más de dos años, ha pasado del millar el número de publicaciones sobre estas células. Y, por la misma razón, el premio Lasker 2009 ha sido concedido a John Gurdon y a Shinya Yamanaka, por sus trabajos sobre reprogramación celular. Asimismo, a la espera de ensayos clínicos exitosos, la posibilidad real de estudiar el efecto de diferentes medicamentos en enfermos de diversas patologías establece ya un éxito notorio en la lucha a favor de la vida humana, como se recoge en recientes artículos sobre el estado de la investigación con estas células (29).

A comienzos de este año, con algo más de perspectiva, el primer número de la revista *Nature Methods* se ha dedicado especialmente a las células iPS y reconoce la reprogramación celular como *método del año*. Tras revisar en los párrafos anteriores algunas de las muchas investigaciones recientes con células iPS, coincidimos con esta publicación en que la reprogramación celular es el método más adecuado para el estudio y la comprensión de diversas enfermedades, pues abre unas perspectivas sorprendentes en la actual investigación biomédica (30).

Para finalizar, la revista *Nature* tiene un apartado sobre plasticidad celular en el que se revisan los distintos procedimientos para la obtención de células madre y su utilidad para el avance en el conocimiento de los procesos de reprogramación y diferenciación,



así como su posible aplicación médica (31). En uno de los artículos se concluye que las células iPS son también las más apropiadas para seguir avanzando en el descubrimiento de nuevos fármacos y la aplicación de futuras terapias celulares (32).

BIBLIOGRAFÍA

1. Xu D, Alipio Z, Fink LM, Adcock DM, Yang, Yang, Ward DC and Ma Yupo. Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc Natl Acad Sci; USA*, 106, 2009: 808-13.
2. Nombela C. Células madre. Encrucijadas biológicas para la Medicina: del tronco embrionario a la regeneración adulta. Madrid: Editorial EDAF, S.L.; 2007.
3. Thompson J. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Sience* 1998; 282: 1145-7.
4. Amit M, Margulets V, Segev H, Shariki K, Laevsky I, Coleman R & Itskovitz-Eldor J. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biology of Reproduction* 2003; 68: 2150-6. Carpenter MK, Rosler ES, Fisk GJ, Brandenberger R, Ares X, Miura T, Lucero M & Rao MS. Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. *Developmental Dynamics* 2004; 229: 243-58.
5. *Nature Biotechnology*, 2009; 27: 213-14.
6. Gurdon J. The Transplantation of Living Cell Nuclei. *Advances in Morphology*, 1964; 4: 1-43.
7. Gurdon J. Trasplanted nuclei and cell differentiation. *Sientific American*, 1968; 219: 24-35. Jouve N. Explorando los genes. Madrid: Ediciones Encuentro; 2008: 383-426.
8. López Moratalla, N. ¿Clones humanos? *Cuadernos de Bioética*, 2004: 385-404.
9. Stojkovic M. Human embryonic stem cells (hESCs): celebrating 10 years of hESC lines. *Stem Cells*, 2008; 26: 2746. Receg S, Ronaghi M, Stojkovic M. Human embryonic stem cell differentiation toward regional specific neural precursors. *Stem Cells*. 2009; 27: 78-87.
10. Jiang Y et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Naturem* 2002; 418: 41-9. Bordignon C. Stem cell therapies for blood diseases. *Naturem* 2006; 441: 1100-2. Srivastava D, Ivey K N. Potential of stem-cell-based therapies for heart disease. *Naturem* 2006; 441: 1096-9.
11. García-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del Valle E, Zorrilla J, García-Arranz M, et al. Expanded adipose derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical Trial. *Dis Colon Rectum*, 2009; 52: 79-86.



12. González MA, González-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Alleviate Experimental Colitis by Inhibiting Inflammatory and Autoimmune Responses. *Gastroenterology*, 2009; 136: 978-89. González-Rey E, González MA, Varela N, O'Valle F, Hernández Cortés P, Rico L, Büscher D, Delgado M. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T-cell responses and induce regulatory T-cells *in vitro* in reumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. En prensa, 2009.
13. García Olmo D, García Arranz M. Células progenitoras multipotentes obtenidas del tejido adiposo y su aplicación clínica. Monografía de la Real Academia Nacional de Farmacia del Instituto de España, 2009; 27: 208.
14. Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukemia: a comparison study. *Lancet*, 2007; 369: 1947-54.
15. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006; 126: 663-76.
16. Montoliu L. Células pluripotentes inducidas. Monografía de la Real Academia Nacional de Farmacia del Instituto de España, 2009; 27: 88.
17. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 2007; 448: 318-24.
18. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007; 131: 861-72. López Guerrero JA. Células madre y nuevas terapias. Una visión general. Monografía de la Real Academia Nacional de Farmacia del Instituto de España, 2009; 27: 51.
19. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007; 318: 1917-20.
20. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, 2007; 318: 1920-23.
21. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, 2009; 136: 964-77.



22. Sheng Ding et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. *Cell Stem Cell*. 2009; 4: 381-4.
23. Melton D et al. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to bold β -cells. *Nature*. 2008; 455: 627-32.
24. Zhao X-Y, Lv Z, Li W, Zeng F, Zhou Q. Production of mice using iPS cells and tetraploid complementation. *Nature Protocols*, 2010; 5: 963-71.
25. Martin U et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Cord Blood. *Cell Stem Cell*, 2009; 5: 434-41. Izpisua JC et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Cord Blood Using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell*, 2009; 5: 353-57.
26. Les recherches sur l'embryon et le clonage sont-elles encore nécessaires après la découverte des cellules iPS? Interview du professeur Ian Wilmut, *Gène-étique*, Tribune mensuelle, 2009, Mai.
27. Anastasia L, Pelissero G, Venerando B and Tettamanti G. Cell reprogramming: expectations and challenges for chemistry in stem cell biology and regenerative medicine. *Cell Death and Differentiation*, 2010; 17: 1230-37.
28. Baumann K. IN THE NEWS: And the winner is... *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009; 10: 736-7.
29. Ebert AD, Svendsen CN. Human stem cells and drug screening: opportunities and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010; 9: 367-72. Yoshida Y. and Yamanaka S. Recent Stem Cell Advances: Induced Pluripotent Stem Cells for Disease Circulation, 2010; 122: 80-87. Mizuno Y, Chang H, Umeda K, Niwa A,* Iwasa T, Awaya T, Fukada S, Hiroshi Yamamoto H, Yamanaka S, Nakahata T and Heike T. Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *The FASEB Journal* 2010; 24: 2245-53.
30. *Nature Methods*, 2010; 7: 1-85.
31. *Nature*; 465. Insight: Plasticity, 703-45.
32. Yamanaka S, Blau H. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*, 2010; 465: 704-12.



